



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110198710 A

(43)申请公布日 2019.09.03

(21)申请号 201780082490.6

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(22)申请日 2017.12.08

代理人 封新琴

(30)优先权数据

62/432,266 2016.12.09 US

62/571,495 2017.10.12 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/33(2006.01)

A61L 15/18(2006.01)

A61L 31/16(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/065352 2017.12.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/107049 EN 2018.06.14

(71)申请人 西北大学

地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 G·A·阿米尔 S·莫切克

权利要求书2页 说明书10页

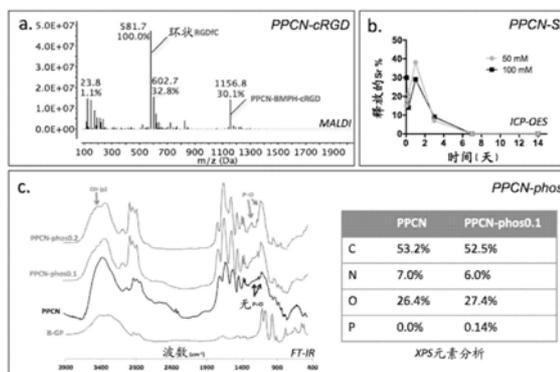
序列表2页 附图8页

(54)发明名称

骨促进性温敏大分子

(57)摘要

本文提供可注射的温敏水凝胶,其在室温下为液体,提供载体材料并且在体温下胶凝以允许控释。具体而言,提供了基于PPCN的水凝胶,所述基于PPCN的水凝胶具有治疗剂(例如,药物、离子等)掺入其中或附于其上,并且提供了所述基于PPCN的水凝胶的制备方法及其例如用于促进骨形成/修复和/或用于治疗骨病的用途。



1. 一种组合物,其包含:基于PPCN的水凝胶,所述基于PPCN的水凝胶包含柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯和聚-(N-异丙基丙烯酰胺)单体;和至少一种掺入所述基于PPCN的水凝胶中和/或附于其上的生物活性剂。

2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述生物活性剂是掺入所述基于PPCN的水凝胶骨架中的附加单体。

3. 如权利要求2所述的组合物,其中所述生物活性剂是 β -甘油磷酸酯。

4. 如权利要求1所述的组合物,其中所述生物活性剂是附于PPCN水凝胶上的侧基。

5. 如权利要求4所述的组合物,其中所述侧基是小分子。

6. 如权利要求4所述的组合物,其中所述侧基是肽。

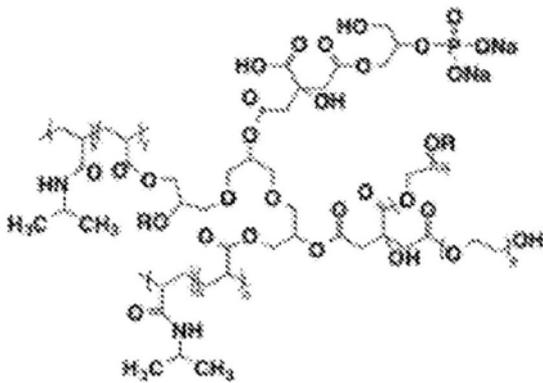
7. 如权利要求6所述的组合物,其中所述生物活性剂是环状Arg-Gly-Asp (cRGD) 肽。

8. 如权利要求1所述的组合物,其中所述生物活性剂是离子交联剂。

9. 如权利要求8所述的组合物,其中所述生物活性剂是 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 或 Sr^{2+} 。

10. 一种组合物,其包含基于PPCN的磷酸展示性水凝胶,所述基于PPCN的磷酸展示性水凝胶包含柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯、聚-(N-异丙基丙烯酰胺)和 β -甘油磷酸酯单体。

11. 如权利要求10所述的组合物,其中所述基于PPCN的磷酸展示性水凝胶包含以下结构:



;

其中x和y独立地为2-20。

12. 如权利要求10所述的组合物,其通过以下方式制备:(a)柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯和 β -甘油磷酸酯单体的缩聚;接着是(b)与聚-(N-异丙基丙烯酰胺)的自由基聚合。

13. 如权利要求10所述的组合物,其通过方案1中描绘的反应制备。

14. 一种组合物,其包含基于PPCN的肽展示性水凝胶,所述基于PPCN的肽展示性水凝胶包含柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯和聚-(N-异丙基丙烯酰胺)单体;和共价缀合至所述柠檬酸单体的羧基的肽。

15. 如权利要求14所述的组合物,其中所述肽通过碳二亚胺化学结构共价缀合至所述柠檬酸单体的羧基。

16. 如权利要求14所述的组合物,其中所述肽是环状Arg-Gly-Asp (cRGD)。

17. 如权利要求16所述的组合物,其中所述cRGD共价缀合至PPCN的羧基。

18. 一种组合物,其包含基于PPCN的水凝胶,所述基于PPCN的水凝胶包含柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯和聚-(N-异丙基丙烯酰胺)单体;和金属离子交联剂。

19. 如权利要求18所述的组合物,其包含金属离子交联的PPCN。

20. 如权利要求19所述的组合物,其通过在所述金属离子的盐的存在下温育所述PPCN而制备。

21. 如权利要求19所述的组合物,其中所述金属离子是 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 或 Sr^{2+} 。

22. 一种促进骨修复的方法,其包括向骨折或患病的骨部位施用如权利要求1-21中的一项所述的组合物,以及使所述组合物胶凝。

23. 如权利要求1-21中的一项所述的组合物用于促进骨修复的用途。

骨促进性温敏大分子

[0001] 相关申请案的交叉引用

[0002] 本申请案要求2016年12月9日提交的美国临时专利申请序列号62/432,266和2017年10月12日提交的美国临时专利申请序列号62/571,495的优先权,这两个临时专利申请的全部内容均以引用方式并入。

技术领域

[0003] 本文提供可注射的温敏水凝胶,其在室温下为液体,提供载体材料并且在体温下胶凝以允许控释。具体而言,提供了基于PPCN的水凝胶,所述基于PPCN的水凝胶具有治疗剂(例如,药物、离子等)掺入其中或附于其上,并且提供了所述基于PPCN的水凝胶的制备方法及其例如用于促进骨形成/修复和/或用于治疗骨病的用途。

背景技术

[0004] 骨组织工程领域的重点已经放在开发用于修复骨缺损的材料上。针对骨病的工作要少得多。因而,材料强度,而不是材料诱导骨形成的能力,一直是主要焦点。这些材料通常是较硬的、生物惰性(例如,甲基丙烯酸甲酯)或脆性(例如,磷酸钙)的填料膏体。另外,在很大程度上尚未探索炎症和骨质疏松性骨的挑战。未满足的需求在于开发这样的材料,所述材料可用于微创手术以符合独特骨折部位,可与复杂的细胞环境相互作用以加速所有骨型的愈合,诱导干细胞变成骨细胞,并且在必要时允许局部化的药物递送。

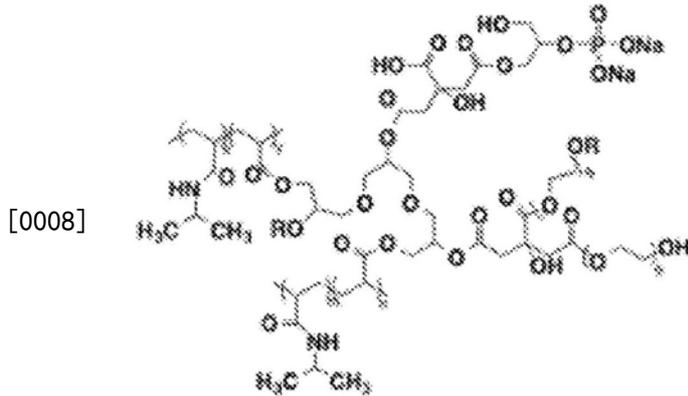
发明内容

[0005] 本文提供可注射的温敏水凝胶,其在室温下为液体,提供载体材料并且在体温下胶凝以允许控释。具体而言,提供了基于PPCN的水凝胶,所述基于PPCN的水凝胶具有治疗剂(例如,药物、离子等)掺入其中或附于其上,并且提供了所述基于PPCN的水凝胶的制备方法及其例如用于促进骨形成/修复和/或用于治疗骨病的用途。

[0006] 在一些实施方案中,本文提供了组合物,其包含基于PPCN的水凝胶,所述基于PPCN的水凝胶包含柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯和聚-(N-异丙基丙烯酰胺)单体;和至少一种掺入所述基于PPCN的水凝胶中和/或附于其上的生物活性剂。在一些实施方案中,所述生物活性剂是掺入所述基于PPCN的水凝胶骨架中的附加单体。在一些实施方案中,所述生物活性剂是 β -甘油磷酸酯。在一些实施方案中,所述生物活性剂是附于PPCN水凝胶上的侧基。在一些实施方案中,所述侧基是小分子。在一些实施方案中,所述侧基是肽。在一些实施方案中,所述生物活性剂是环状Arg-Gly-Asp(cRGD)肽。在一些实施方案中,所述生物活性剂是离子交联剂。在一些实施方案中,所述生物活性剂是 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 或 Sr^{2+} 。

[0007] 在一些实施方案中,本文提供了组合物,所述组合物包含基于PPCN的磷酸展示性水凝胶,所述基于PPCN的磷酸展示性水凝胶包含柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯、聚-(N-异丙基丙烯酰胺)和 β -甘油磷酸酯单体。在一些实施方案中,所述基于

PPCN的磷酸展示性水凝胶包含以下结构：



；

[0009] 其中x和y独立地为2-20。在一些实施方案中，所述组合物通过以下方式制备：(a) 柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯和β-甘油磷酸酯单体的缩聚；接着是(b) 与聚-(N-异丙基丙烯酰胺)的自由基聚合。在一些实施方案中，所述组合物通过方案1中描绘的反应制备。

[0010] 在一些实施方案中，本文提供了组合物，其包含基于PPCN的肽展示性水凝胶，所述基于PPCN的肽展示性水凝胶包含柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯和聚-(N-异丙基丙烯酰胺)单体，以及共价缀合至所述柠檬酸单体的羧基的肽。在一些实施方案中，所述肽通过碳二亚胺化学结构共价缀合至所述柠檬酸单体的羧基。在一些实施方案中，所述肽是环状Arg-Gly-Asp(cRGD)。在一些实施方案中，所述cRGD共价缀合至PPCN的羧基。在一些实施方案中，所述组合物通过方案2中描绘的反应制备。

[0011] 在一些实施方案中，本文提供了组合物，其包含基于PPCN的水凝胶，所述基于PPCN的水凝胶包含柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯和聚-(N-异丙基丙烯酰胺)单体；以及金属离子交联剂。在一些实施方案中，组合物包含金属离子交联的PPCN。在一些实施方案中，组合物通过在所述金属离子的盐的存在下温育所述PPCN来制备。在一些实施方案中，所述金属离子是Ca²⁺、Ba²⁺或Sr²⁺。

[0012] 在一些实施方案中，本文提供了促进骨修复的方法，其包括向骨折或患病的骨部位施用本文所述的组合物(例如，基于PPCN的水凝胶)，以及使所述组合物胶凝。

[0013] 在一些实施方案中，本文提供了本文所述的组合物(例如，基于PPCN的水凝胶)用于促进骨修复的用途。

附图说明

[0014] 图1. (a) PPCN-cRGD主峰的MALDI图谱包括581.7m/z处的预期离子化环状RGDfC和1156m/z处的完整单体。(b) 来自PPCN-Sr凝胶的50mM和100mM Sr²⁺释放的ICP-OES揭示大部分锶在1周内释放。PPCN-phos的FT-IR显示出与试剂β-甘油磷酸酯相关的峰值增长，即3400nm⁻¹处OH伸缩的加宽以及约1238nm⁻¹处归因于磷酸酯的新峰增长。元素分析确证了该数据，由于β-甘油磷酸酯置换富碳PEG链导致碳略有减少。

[0015] 图2. PPCN (a) 相比于PPCN-cRGD (b)、PPCN-Sr (c) 和PPCN-phos (d) 的流变学表征证实三种骨诱导变体全部保持温敏性并且表现出比PPCN更低的LCST转变。

[0016] 图3. 接种在3D凝胶中并且在常规DMEM中培养的hMSC和MC3T3的LIVE/DEAD成像。将细胞接种在藻酸盐、PPCN、PPCN-cRGD、PPCN-Sr或PPCN-phos凝胶中。在PPCN-cRGD凝胶中生长的细胞显示出铺展形态,证实RGD的官能度在缀合后保持。所有凝胶中的活力均高于75%。在第10天拍摄图像并且示出来自n=3个孔的代表性图像。

[0017] 图4. 示出了第3天和第10天 (a) hMSC和 (b) MC3T3的碱性磷酸酶 (ALP) 活性。第10天未检测到hMSC的显著ALP增加。然而,检测到了在PPCN-Sr和PPCN-phos凝胶中生长的MC3T3的显著ALP增加。*P值<0.05及**P值<0.01。

[0018] 图5. 在第21天通过对钙沉积进行茜素红S (Alizarin Red S) 染色,对骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 和骨钙蛋白 (osteocalcin, OCN) 进行免疫组织化学分析而对hMSC进行的表征。右侧显示了相应定量。在全部三个官能化中都看到了矿化。根据数据,在PPCN-Sr中骨桥蛋白表达最高,并且在PPCN-phos中骨钙蛋白表达最高。

[0019] 图6. 示出了从第0天到第42天,对股肌内注射PPCN和PPCN-Sr的显微CT分析。右上侧小图使显微CT图像朝向小鼠股骨。右下侧小图示出了显微CT图像的定量,n=3。从第10天开始在PPCN-Sr组中观察到矿化,并且矿化在6周内持续增加。在非官能化PPCN对照中未观察到矿化。用Osirix通过阈值强度来量化矿化区域并且重建以显示3D嵌体。

[0020] 图7. PPCN-Sr与PPCN对照 (a) 相比显示显著的骨钙蛋白表达和细胞浸润 (b)。如通过红色钙沉淀所检测的并与非官能化PPCN (c) 相比,对矿化的茜素红S染色也显示出PPCN-Sr (d) 中的稳固矿化。分别在 (e) 和 (f) 中示出了PPCN和PPCN-Sr的全组织切片。

[0021] 图8. 在第42天对8个小鼠器官的ICP分析显示消化后任何主要器官中均不存在锶 (a)。另外,对切片肌肉组织的XPS分析显示注射部位的锶被清除并且不再存在 (b)。XPS分析显示钙、磷酸盐和氧含量与PPCN-Sr组中的矿化一致,但在第6周时无剩余局部锶。

[0022] 定义

[0023] 尽管与本文描述的方法和材料类似或等效的任何方法和材料可用于实践或测试本文所述的实施方案,但本文描述了一些优选的方法、组合物、装置和材料。然而,在描述本发明的材料和方法之前,应理解本发明不限于本文所述的特定分子、组合物、方法或方案,因为这些可根据常规实验和优化而变化。还应理解,说明书中使用的术语仅仅是为了描述特定版本或实施方案的目的,并非旨在限制本文所述的实施方案的范围。

[0024] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。然而,如果发生冲突,将以本说明书,包括定义为准。因此,在本文所述的实施方案的上下文中,以下定义适用。

[0025] 如本文和所附权利要求中所用,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一”、“一个(一种)”和“所述(该)”包括复数指代。因此,例如,提及“一种聚合物”是提及一种或多种聚合物及其本领域技术人员已知的等效物,等等。

[0026] 如本文所用,术语“和/或”包括所列项的任何和所有组合,包括列出项中的任何单独项。例如,“A、B和/或C”涵盖A、B、C、AB、AC、BC和ABC,将其中的每一个都视为用语句“A、B和/或C”进行单独描述。如本文所用,术语“包含”及其语言变型表示存在所列举的特征、要素、方法步骤等,而不排除存在附加特征、要素、方法步骤等。相反,术语“由.....组成”及其语言变型表示存在所列举的特征、要素、方法步骤等,并且除通常相关的杂质外,不包括任何未列举的特征、要素、方法步骤等。短语“基本上由.....组成”表示所列举的特征、要

素、方法步骤等,以及不会对组合物、系统或方法的基本性质产生实质性影响的任何附加特征、要素、方法步骤等。本文的许多实施方案使用开放式“包含”语言来描述。此类实施方案涵盖多个封闭式“由.....组成”和/或“基本上由.....组成”实施方案,其可替代地使用此类语言来要求保护或进行描述。

[0027] 如本文所用,术语“基本上所有”、“基本上完全”和类似术语是指大于99%;术语“基本上没有”、“基本上不含”和类似术语是指小于1%。

[0028] 术语“约”允许值或范围的一定程度的可变性。如本文所用,术语“约”是指在所列举的值或范围的10%以内的值(例如,约50等同于45-55)。

[0029] 如本文所用,术语“聚合物”是指重复结构单元或“单体”的链,通常具有大分子量。聚合物的示例包括均聚物(单一类型的单体亚单元)、共聚物(两种类型的单体亚单元)和杂聚物(例如,三种或更多种类型的单体亚单元)。如本文所用,术语“低聚物”是指仅几个单体单元(例如,2、3、4、5个或更多个)至约50个单体单元的聚合物,例如二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体.....十聚体等。

[0030] 如本文所用,术语“线性聚合物”是指其中分子形成长链而没有分支或交联结构的聚合物。

[0031] 如本文所用,术语“支化聚合物”是指包含聚合物主链以及一个或多个附加单体,或具有从聚合物主链延伸的链或单体的聚合物。“分支”的相互连接程度不足以使聚合物不溶。

[0032] 如本文所用,术语“预聚物”是指具有在适当条件下交联(例如,“固化”和/或形成热固树脂或水凝胶)的能力,但尚未经受所述适当条件的线性或支化聚合物(例如,未显著交联的)。

[0033] 如本文所用,术语“交联聚合物”是指在多条聚合物链之间具有显著程度的相互连接的聚合物,显著程度的相互连接的结果是不溶性聚合物网络。例如,多条聚合物链可在其结构内的多个点(不限于聚合物链的末端)处彼此交联。

[0034] 如本文所用,术语“生物相容性”是指当施用于受试者时不产生或引起显著不良作用的材料、化合物或组合物。限制生物相容性的可能不良作用的示例包括但不限于过度炎症、过度或不良免疫应答和毒性。

[0035] 如本文所用,术语“水凝胶”是指在水中溶胀而不是溶解的亲水性聚合物的三维(3D)交联网络。

[0036] 如本文所用,术语“温敏”是指在不同温度范围表现出改变的物理特性的材料。本文中特别相关的是“相变温敏”材料。相变温敏”材料在第一温度范围(例如,低于26°C)下是可溶的或为液态,并且在第二温度范围(例如,30-45°C)下是不溶的或为固态。

具体实施方式

[0037] 本文提供可注射的温敏水凝胶,其在室温下为液体,为离子或治疗剂提供载体材料,并且在体温下提胶凝以允许控释。在一些实施方案中,材料是抗氧化剂并且基于材料性质可以在无需成骨补充物的情况下促进骨形成。在一些实施方案中,材料包含例如骨促进剂,诸如磷酸盐、cRGD和/或锶。

[0038] 在一些实施方案中,本文提供了温敏水凝胶,其包含柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二

甘油醇酸二丙烯酸甘油酯和聚-(N-异丙基丙烯酰胺)单体。在一些实施方案中,温敏水凝胶是基于PPCN的水凝胶。在一些实施方案中,基于PPCN的水凝胶包含柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯和聚-(N-异丙基丙烯酰胺)单体及一种或多种附加单体类(例如, β -甘油磷酸酯)。在一些实施方案中,基于PPCN的水凝胶包含柠檬酸、聚(乙二醇)、1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯和聚-(N-异丙基丙烯酰胺)单体并且缀合至一种或多种生物活性剂(例如,金属离子(例如, Sr^{2+})、肽(例如,cRGD)等)。

[0039] 在一些实施方案中,基于PPCN的水凝胶上(例如,柠檬酸单体上展示的)带负电的羧基缀合带正电的金属离子(例如, Sr^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 等)。在一些实施方案中,金属离子与单独的羧基的配位在基于PPCN的聚合物中产生交联。在一些实施方案中,本文的材料不受金属离子特性的限制。在一些实施方案中,金属离子作为盐引入到基于PPCN的材料中。

[0040] 在一些实施方案中,基于PPCN的水凝胶上的(例如,柠檬酸单体上展示的)羧基通过适当的连接子化学缀合至肽或生物活性小分子。在一些实施方案中,用于将生物活性肽和/或小分子连接至基于PPCN的水凝胶的合适化学结构包括炔/叠氮化物、硫醇/马来酰亚胺、硫醇/卤代乙酰基(例如,碘乙酰基等)、硫醇/吡啶基二硫化物(例如,吡啶二硫醇等)、磺酰叠氮化物/硫代酸等。

[0041] 在一些实施方案中,促进骨愈合和/或修复的生物活性肽缀合至基于PPCN的水凝胶。合适的肽包括P-15肽(Bhatnagar等人,Tissue Eng.1999;5(1):53-65.;其全部内容以引用方式并入)、含RGD的肽(Ruoslahti和Pierschbacher.Cell.1986;44(4):517-8.;其全部内容以引用方式并入)、GFOGER(甘氨酸-苯丙氨酸-羟脯氨酸-甘氨酸-谷氨酸-精氨酸)(SEQ ID NO:1)、胶原蛋白结合基序(CBM)、DGEA(Asp-Gly-Glu-Ala)(SEQ ID NO:2)、SVVYGLR(Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg)(SEQ ID NO:3)、KRSR(赖氨酸-精氨酸-丝氨酸-精氨酸)(SEQ ID NO:4)、FHRRKA(Phe-His-Arg-Arg-Ile-Lys-Ala)(SEQ ID NO:5)、纤连蛋白(FN)来源的肽和其它ECM来源的肽(Pountos等人B MC Med.2016;14:103.;其全部内容以引用方式并入)。

[0042] 在一些实施方案中,PPCN或基于PPCN的聚合物或水凝胶包含包含至少0.1%柠檬酸单体(例如,>0.1%、>0.2%、>0.5%、>1%、>2%、>3%、>4%、>5%、>10%、>20%、>30%、>40%、>50%、>60%、>70%、>80%、>90%、>95%、>98%、>99%)。在一些实施方案中,本文的聚合物包含少于99%柠檬酸单体(例如,<99%、<98%、<95%、<90%、<80%、<70%、<60%、<50%、<40%、<30%、<20%、<10%、<5%、<4%、<3%、<2%、<1%、<0.5%)。在一些实施方案中,聚合物包含约99%、约98%、约95%、约90%、约80%、约70%、约60%、约50%、约40%、约30%、约20%、约10%、约5%、约4%、约3%、约2%、约1%或约0.5%柠檬酸单体。

[0043] 在一些实施方案中,PPCN或基于PPCN的聚合物或水凝胶包含包含至少0.1%聚乙二醇单体(例如,>0.1%、>0.2%、>0.5%、>1%、>2%、>3%、>4%、>5%、>10%、>20%、>30%、>40%、>50%、>60%、>70%、>80%、>90%、>95%、>98%、>99%)。在一些实施方案中,本文的聚合物包含少于99%聚乙二醇单体(例如,<99%、<98%、<95%、<90%、<80%、<70%、<60%、<50%、<40%、<30%、<20%、<10%、<5%、<4%、<3%、<2%、<1%、<0.5%)。在一些实施方案中,聚合物包含约99%、约98%、约95%、约90%、约80%、约70%、约60%、约50%、约40%、约30%、约20%、约10%、约5%、约4%、约3%、约2%、约1%或约0.5%聚乙二醇单体。

[0044] 在一些实施方案中,PPCN或基于PPCN的聚合物或水凝胶包含至少0.1%1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯单体(例如,>0.1%、>0.2%、>0.5%、>1%、>2%、>3%、>4%、>5%、>10%、>20%、>30%、>40%、>50%、>60%、>70%、>80%、>90%、>95%、>98%、>99%)。在一些实施方案中,本文的聚合物包含少于99%1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯单体(例如,<99%、<98%、<95%、<90%、<80%、<70%、<60%、<50%、<40%、<30%、<20%、<10%、<5%、<4%、<3%、<2%、<1%、<0.5%)。在一些实施方案中,聚合物包含约99%、约98%、约95%、约90%、约80%、约70%、约60%、约50%、约40%、约30%、约20%、约10%、约5%、约4%、约3%、约2%、约1%或约0.5%1,3-二甘油醇酸二丙烯酸甘油酯单体。

[0045] 在一些实施方案中,PPCN或基于PPCN的聚合物或水凝胶包含至少0.1%N-异丙基丙烯酰胺(例如,>0.1%、>0.2%、>0.5%、>1%、>2%、>3%、>4%、>5%、>10%、>20%、>30%、>40%、>50%、>60%、>70%、>80%、>90%、>95%、>98%、>99%)。在一些实施方案中,本文的聚合物包含少于99%N-异丙基丙烯酰胺(例如,<99%、<98%、<95%、<90%、<80%、<70%、<60%、<50%、<40%、<30%、<20%、<10%、<5%、<4%、<3%、<2%、<1%、<0.5%)。在一些实施方案中,聚合物包含约99%、约98%、约95%、约90%、约80%、约70%、约60%、约50%、约40%、约30%、约20%、约10%、约5%、约4%、约3%、约2%、约1%或约0.5%N-异丙基丙烯酰胺。

[0046] 在一些实施方案中,本文所述的材料包含具有本文所述的基于PPCN的温敏水凝胶材料和一种或多种附加组分的复合材料。在一些实施方案中,附加组分占复合材料的1-99重量%(例如,1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%,或其间的范围)。在一些实施方案中,复合材料包含至少1%(例如,>>1%、>2%、>3%、>4%、>5%、>10%、>20%、>30%、>40%、>50%、>60%、>70%、>80%、>90%、>95%、>98%、>99%)基于PPCN的水凝胶。在一些实施方案中,复合材料包含小于99%(例如,<99%、<98%、<95%、<90%、<80%、<70%、<60%、<50%、<40%、<30%、<20%、<10%、<5%、<4%、<3%、<2%、<1%)基于PPCN的水凝胶。在一些实施方案中,复合材料包含基于PPCN的水凝胶,其量为约99%、约98%、约95%、约90%、约80%、约70%、约60%、约50%、约40%、约30%、约20%、约10%、约5%、约4%、约3%、约2%、约1%或其间的范围。前述百分比可为重量%或摩尔%。

[0047] 在一些实施方案中,提供了具有基于PPCN的温敏水凝胶材料和生物陶瓷组分的复合材料。合适的生物陶瓷包括羟磷灰石(HA; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)、磷酸三钙 β (BTCP; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$),及HAP和BTCP的混合物。

[0048] 在一些实施方案中,复合材料包含基于PPCN的水凝胶和一种或多种附加聚合物组分。合适的生物可降解聚合物包括但不限于:胶原蛋白、弹性蛋白、透明质酸及衍生物、海藻酸钠及衍生物、壳聚糖及衍生物明胶、淀粉、纤维素聚合物(例如甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、乙酸琥珀酸纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素)、酪蛋白、葡聚糖及衍生物、多糖、聚(己内酯)、纤维蛋白原、聚(羟酸)、聚(L-丙交酯)聚(D,L丙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)、乳酸和乙醇酸的共聚物、 ϵ -己内酯和丙交酯的共聚物、乙交酯和 ϵ -己内酯的共聚物、丙交酯和1,4-二噁烷-2-酮的共聚物,包括单体D-丙交酯、L-丙交酯、D,L-丙交酯、乙交酯、 ϵ -

己内酯、三亚甲基碳酸酯、1,4-二噁烷-2-酮或1,5-二氧杂环庚烷-2-酮的一个或多个残基单元的聚合物和共聚物,聚(乙交酯)、聚(羟基丁酸酯)、聚(碳酸烷基酯)和聚(原酸酯)、聚酯、聚(羟基戊酸)、聚二噁烷酮、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)、聚(苹果酸)、聚(丙醇二酸)、聚酸酐、聚磷腈、聚(氨基酸)和上述聚合物的共聚物以及上述聚合物的共混物和组合。(通常参见Illum,L.,Davids,S.S.(编辑)“Polymers in Controlled Drug Delivery”Wright, Bristol,1987;Arshady,J.Controlled Release 17:1-22,1991;Pitt,Int.J.Pharm.59:173-196,1990;Holland等人,J.Controlled Release 4:155-0180,1986;其全部内容以引用方式并入本文)。合适的非生物可降解的聚合物包括硅橡胶、聚乙烯、丙烯酸树脂、聚氨酯、聚丙烯和聚甲基丙烯酸甲酯。

[0049] 如全篇所述,本文提供了基于PPCN的材料,其包含可固化(例如,温敏)水凝胶和/或其复合材料。这些材料可用于多种应用。例如,需要以液体和/或可溶形式施加材料,然后当暴露于所需条件(例如,生理温度)时(快速)使其变成固体和/或不可溶的任何应用。本文所述的材料可用于例如医学和牙科骨修复应用,诸如修复颅面损伤,稳定化复杂性骨折,促进骨生长、骨再生,作为骨空隙填充物,粘附植入物等。在一些实施方案中,材料可用于非医学/牙科应用。在一些实施方案中,本文所述的基于PPCN的材料在亚生理温度(例如,36°C、35°C、34°C、33°C、32°C、31°C、30°C、29°C、28°C、27°C、26°C、25°C、24°C、23°C、22°C、21°C、20°C,或更低或介其间的范围)下为液体。在一些实施方案中,本文所述的基于PPCN的材料在生理温度或接近生理温度(例如,30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C,或介于其间的范围)下胶凝。

[0050] 在本文中的材料用于骨或骨折/骨损伤的修复、稳定化、再生、生长等的一些实施方案中,所述材料还包含附加组分/试剂以促进向骨内掺入、骨生长、骨再生等。在一些实施方案中,将附加组分/试剂掺入到材料中并随后在固化时包封在材料内。在此类实施方案中,附加组分/试剂与所述材料的基于PPCN的水凝胶和其他组分非共价缔合。在其他实施方案中,附加组分/试剂是共价连接的基于PPCN的水凝胶。

[0051] 在一些实施方案中,本文所述的材料可用于递送生长因子或其他生物活性剂,以用于骨缺损的修复和/或骨再生。适合用于本文实施方案的试剂包括骨形态发生蛋白(例如BMP-1、BMP-2、BMP-4、BMP-6和BMP-7);转化生长因子 β (TGF- β)超家族成员,包括但不限于TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3;生长分化因子(GDF1、GDF2、GDF3、GDF5、GDF6、GDF7、肌肉生长抑制素/GDF8、GDF9、GDF10、GDF11和GDF15);血管内皮生长因子(VEGF);成纤维细胞生长因子(FGF);等等。这些试剂或其他试剂可与本文所述的材料或其组分共价连接,与本文所述的材料或其组分上展示的部分非共价缔合,嵌入本文所述的材料中等。

[0052] 在一些实施方案中,本文的基于PPCN的水凝胶可用作治疗剂(例如,骨质疏松药物)、细胞(例如,干细胞)、生长因子等的载体。在一些实施方案中,本文的基于PPCN的水凝胶提供对包封在其中的生物活性剂的受控、局部递送。

[0053] 在一些实施方案中,本文提供了方法,其包括向骨缺损或骨折处施用包含本文所述的基于PPCN的水凝胶的组合物。在一些实施方案中,本文提供了本文所述的基于PPCN的水凝胶用于修复骨缺损或骨折的用途。

[0054] 在一些实施方案中,将本文所述的基于PPCN的水凝胶注射到骨折部位(例如,在骨科手术期间)以促进和/或加速愈合。

[0055] 实验

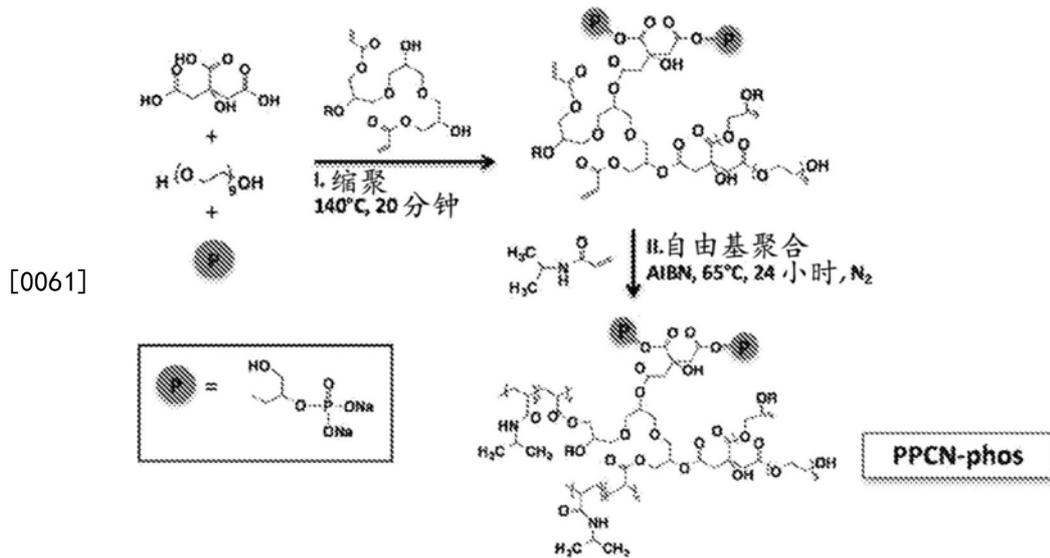
[0056] 细胞培养

[0057] 对于凝胶研究,将人间充质干细胞(hMSC, ATCC)在补充有10%FBS和5ml 10x青霉素-链霉素并且没有其他成骨补充物的杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)中培养。在这些研究中使用的hMSC为第6代或以下。将鼠前成骨细胞MC3T3-E1细胞(ATCC)在DMEM:F12中培养。两个细胞系均在37°C和5%二氧化碳(CO₂)下培养。

[0058] 材料制备和表征

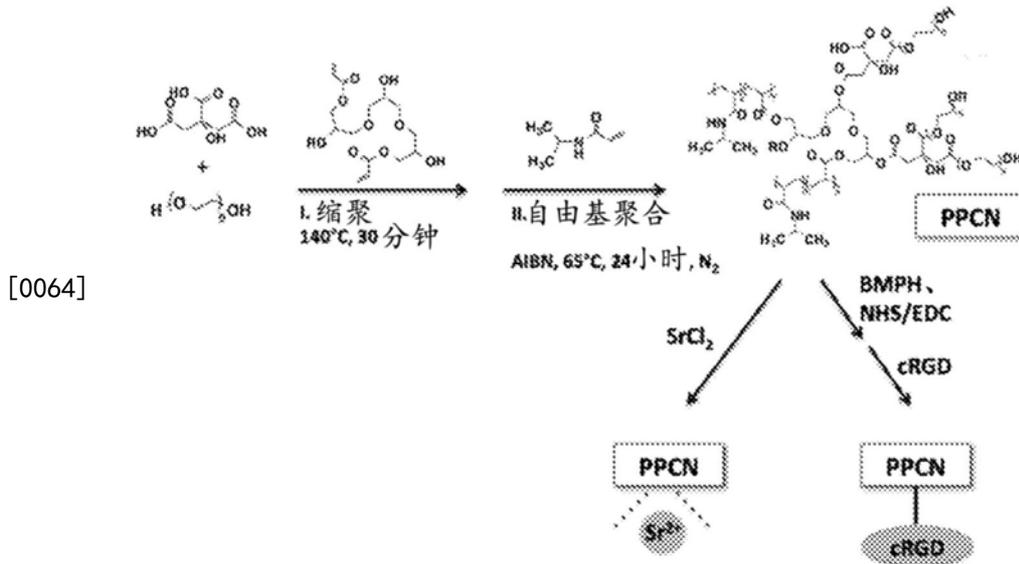
[0059] 通过缩聚和后续的自由基聚合制备PPCN(聚(聚乙二醇柠檬酸酯-共-N-异丙基丙烯酰胺))。

[0060] 为了制备PPCN-phos,将原始PPCN合成调整为在第一缩聚步骤中添加0.1摩尔比的β-甘油磷酸酯(方案1)。后续反应步骤不变。



[0062] 方案1.PPCN-phos合成的合成方案。在PPCN合成的步骤1(缩聚)中以0.1或0.2摩尔比添加β-甘油磷酸酯。显示了所提出的磷酸酯附着位置—特别是通过β-甘油磷酸酯的反应性羟基与柠檬酸的可用羧基之间的反应来显示。在后续细胞研究中使用0.1摩尔比的PPCN-phos,因为更高的摩尔比表现出过度交联。

[0063] 为了制备PPCN-cRGD凝胶,如所报道的那样形成PPCN。然后,使环状RGDfC肽(ABI Scientific)通过马来酰亚胺化学结构共价缀合至PPCN聚合物链内的柠檬酸的可用羧基(方案2)。环状RGD肽的预期密度为10%。



[0065] 方案2. PPCN-Sr和PPCN-cRGD合成的合成方案。如先前报道的那样,通过缩聚和后续的自由基聚合制备PPCN。然后,通过使环状RGDFc肽通过马来酰亚胺化学结构共价缀合至PPCN聚合物链内的柠檬酸的可用羧酸基团,来制备PPCN-cRGD凝胶。为了制备PPCN-Sr凝胶,将PPCN以100mg/ml溶解在PBS (1x) 中。将100mM的SrCl₂·6H₂O (Sigma) 混合到PPCN/PBS溶液中,并在使用前使其在4°C下交联过夜。

[0066] 为了制备PPCN-Sr凝胶,将PPCN以100mg/ml溶解在PBS (1x) 中。将100mM的SrCl₂·6H₂O (Sigma) 混合到PPCN/PBS溶液中并使其在4°C下交联过夜(方案2)。

[0067] 图1示出了凝胶的表征。通过基质辅助激光解吸电离(MALDI)证实PPCN-cRGD缀合(图1a)。用 α -氰基-4-羟基肉桂酸基质制备样品。经由电感耦合等离子体发射光谱(Thermo iCAP 7600 ICP-OES),通过锶释放研究来表征PPCN-Sr。将凝胶浸入模拟体液中并在14天的时间过程中去除溶液并测定Sr²⁺浓度(图1b)。通过FT-IR (Bruker Tensor 37) 和XPS来表征PPCN-phos(图1c)。进一步的流变学表征在TA仪器DHR流变仪上进行,该TA仪器DHR流变仪具有20mm 2°锥形珀耳帖板几何形状和溶剂捕集器盖以最小化样品蒸发。在从15°C至45°C的温度渐变实验中以5°C/分钟的加热速率研究凝胶。在施加的10rad/s角频率和5%的应变幅度下监测粘弹性模量。所有样品均使用52 μ m的间隙高度。粘弹性性质的初始变化的特征在于储能模量(G')增加超过损耗模量(G'')。

[0068] 3D分化研究

[0069] 将细胞封装在100mg/mL PPCN在PBS (1x) 中的各种温敏PPCN溶液中。通过均匀混合将细胞以1 \times 10⁵个细胞/mL液体PPCN的浓度添加到溶液中。将细胞-PPCN混合物在37°C下温育5分钟以使凝胶形成。一旦形成凝胶,就在顶部添加温热的培养基并且每2天更换一次。在接种之前,将板用Sigma-cote包被以防细胞附着到板上,从而确保在培养基更换期间持续存在的所有细胞持续存在于3D凝胶环境中。在处理过程中,将板保持在板保温器上以确保凝胶不会由于温度波动而溶解或稀释。在每个时间点,去除培养基并收集凝胶并且在ALP和DNA分析的情况下将其冷冻或在LIVE/DEAD、茜素红染色和免疫组织化学分析的情况下直接测定。

[0070] 骨分化测定

[0071] 对于骨分化的早期检测(图4),测量了碱性磷酸酶(ALP)。在第3天和第10天收集凝

胶,并通过荧光试剂盒 (Biovision) 检测细胞外碱性磷酸酶 (ALP) 活性。添加非荧光底物,即 4-甲基伞形酮磷酸二钠盐 (MUP),并通过ALP裂解,产生荧光信号 (Ex/Em=360/440nm)。在酶标仪上读取荧光。基于连续稀释的凝胶标准品来计算酶活性,并用同时Quant-iT PicoGreen测定法 (Thermo Fisher) 归一化为总DNA含量。

[0072] 对于骨分化的晚期检测 (图5),进行了骨钙蛋白 (OCN) 和骨桥蛋白 (OPN) 的茜素红S染色和免疫组织化学分析。对于茜素红S,将细胞固定在温热的凝胶内,使染剂渗透凝胶,同时随后经几次去离子水洗涤而冲洗掉过量染剂。用光学显微镜观察矿化。对于免疫组织化学分析,将细胞固定在温热的凝胶内,并添加OPN或OCN的一抗并用DAPI进行复染。

[0073] 矿化

[0074] 为了评定矿化,用异氟烷麻醉小鼠并将其置于加热的显微CT床上。用临床前显微PET/CT成像系统nanoScan扫描仪 (Mediso-USA, Boston, MA) 获取图像。以“中等”放大倍数、33 μ m焦斑、1 \times 1面元划分 (binning) 获取数据,在整圆上具有720个投影视图,曝光时间为300ms。使用35kVp获取图像。使用来自Mediso的滤波反投影软件以68 μ m的体素大小重建投影数据。将重建数据在用于Mac的Osirix Lite中可视化和分段。使用冠状平面,通过使用600亨氏单位 (HU) 的下限阈值和10,000HU的上限阈值创建具有2D区域增长的感兴趣区域 (ROI) 来量化图像。使用感兴趣区域 (ROI) 通过计算每个ROI的平均HU (骨为700至3,000HU) 来量化矿化。

[0075] 免疫荧光

[0076] 通过吸入二氧化碳使动物安乐死。收集组织并在4 $^{\circ}$ C下用4%多聚甲醛的PBS溶液固定过夜。用更换几次的PBS洗涤样品,以去除多聚甲醛残余物。将样品用系列乙醇脱水,用二甲苯清除,并包埋在石蜡中。切割5微米厚的切片并固定在载玻片上。用二甲苯处理切片以去除石蜡,用交替的乙醇和水使其水合。将载玻片浸入抗原修复缓冲液 (10mM柠檬酸钠、0.05% Tween 20, pH 6.0) 中并在100 $^{\circ}$ C下加热15分钟。用PBS洗涤后,用5mg/mL BSA、5%正常山羊血清的PBS溶液封闭样品30分钟。将样品与在封闭缓冲液中稀释的一抗在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。用PBS洗涤载玻片3 \times 5分钟,然后在室温下用由封闭缓冲液稀释的二抗温育30分钟。用PBS洗涤载玻片6 \times 5分钟,然后用抗褪色培养基封片并用指甲油密封。用Nikon TE-2000U显微镜或Cytation5图像阅读器拍摄图像。

[0077] 锶分布

[0078] 在几个主要器官 (即心脏、脑部、脾、睾丸、肌肉、肺、肾脏和肝脏) 中测定锶分布。安乐死后,收集各个器官并储存在-80 $^{\circ}$ C直至分析。通过向每个样品中添加70%硝酸和37%过氧化氢进行组织消化。1小时后将样品打开以释放积聚的气体。使组织在室温下消化2天。2天后,将样品在MQ水中稀释成2.4%的酸,并制备以如上所述进行ICP-OES。

[0079] 元素分析

[0080] 在使用Al K- α X射线源 (1486.6eV) 的Thermo Fisher ESCALab 250Xi (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA) 上进行对切片组织的XPS分析。单色X射线束光斑大小为直径300 μ m且功率为100瓦。使用100eV的通能和1eV的步长进行全谱扫描 (survey scan)。对于高分辨率扫描,使用50eV的通量和0.1eV的步长。停留时间为50ms。用284.8eV下的外来碳峰校准XPS光谱。所有XPS数据均使用Avantage软件处理。

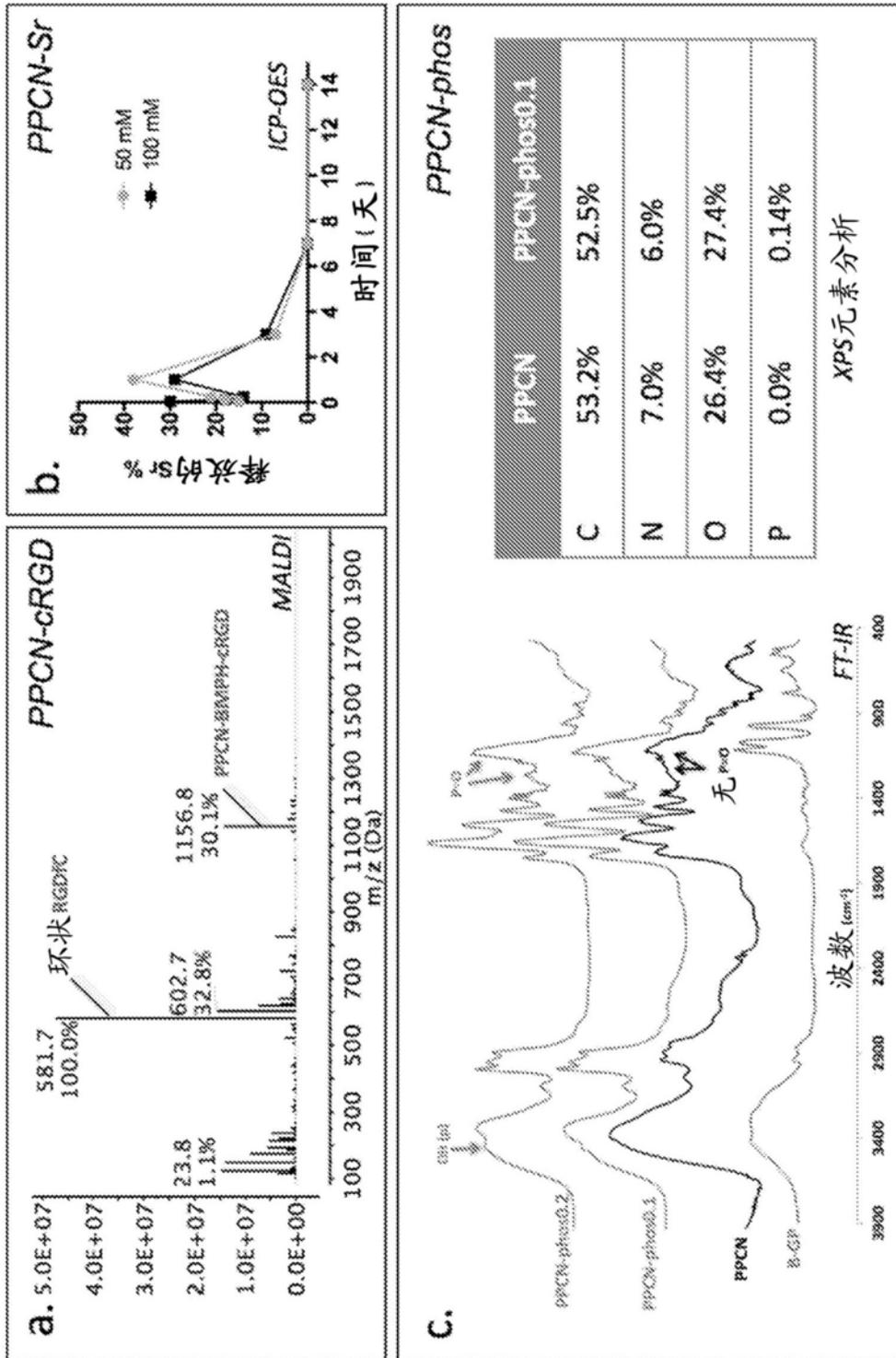


图1

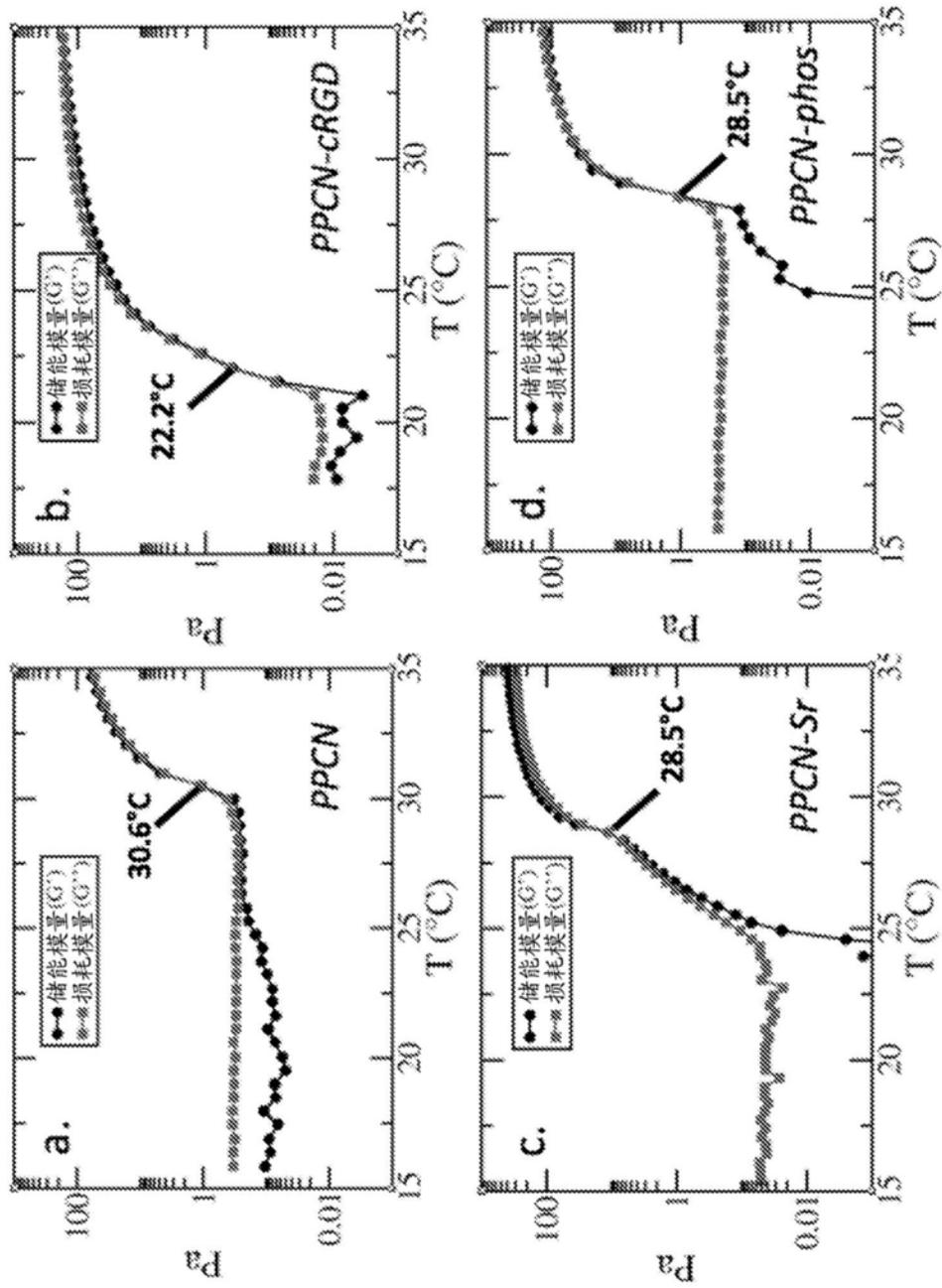


图2

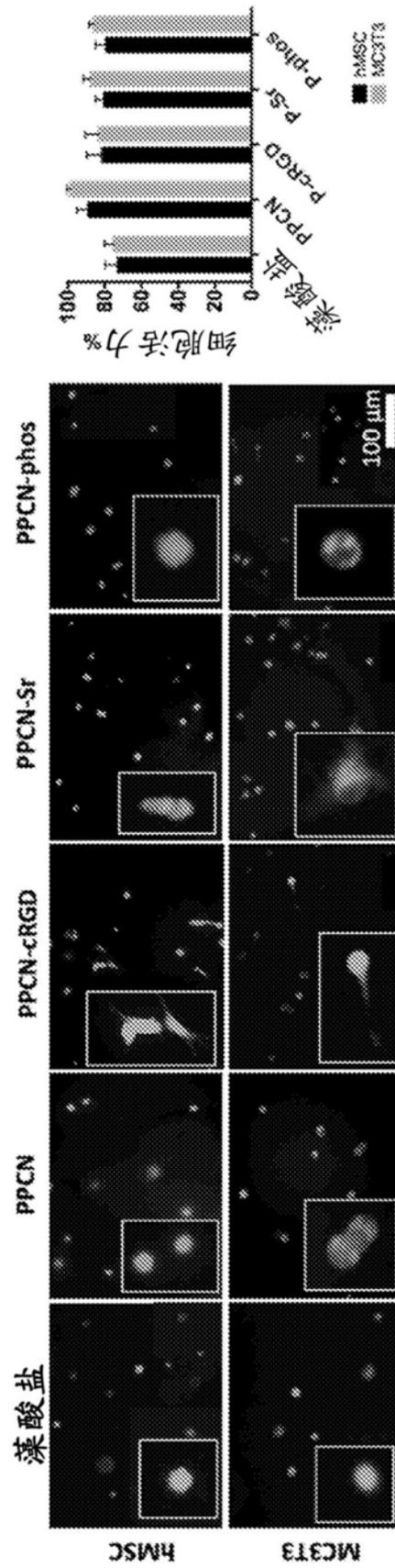


图3

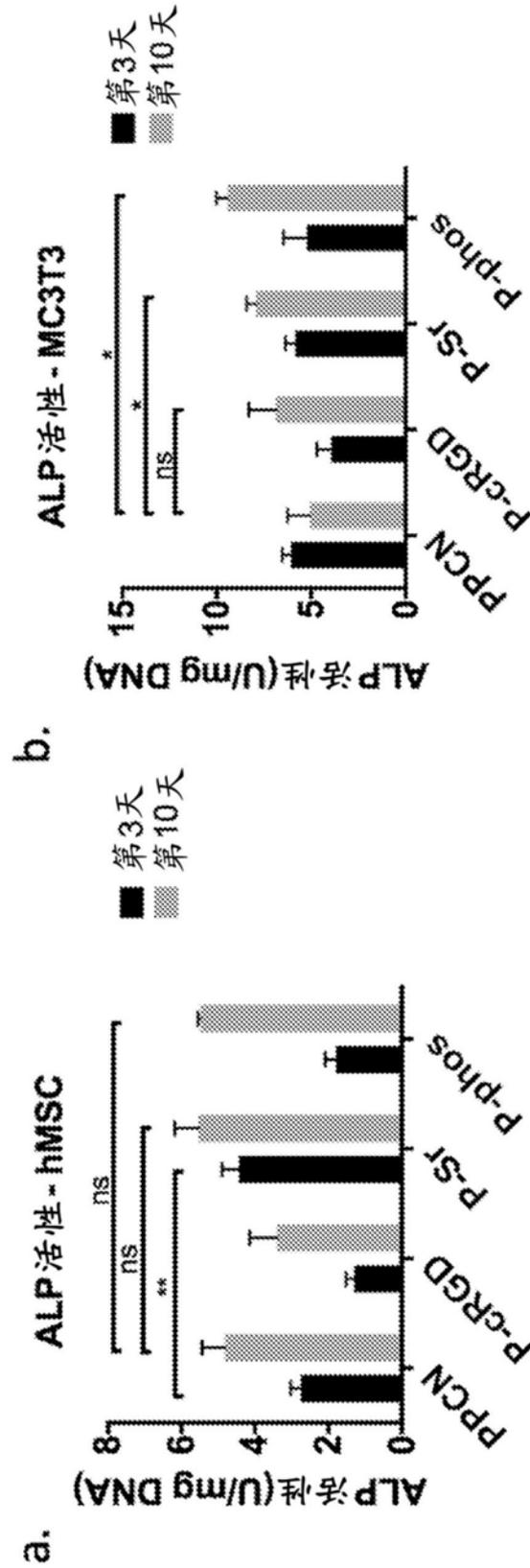


图4

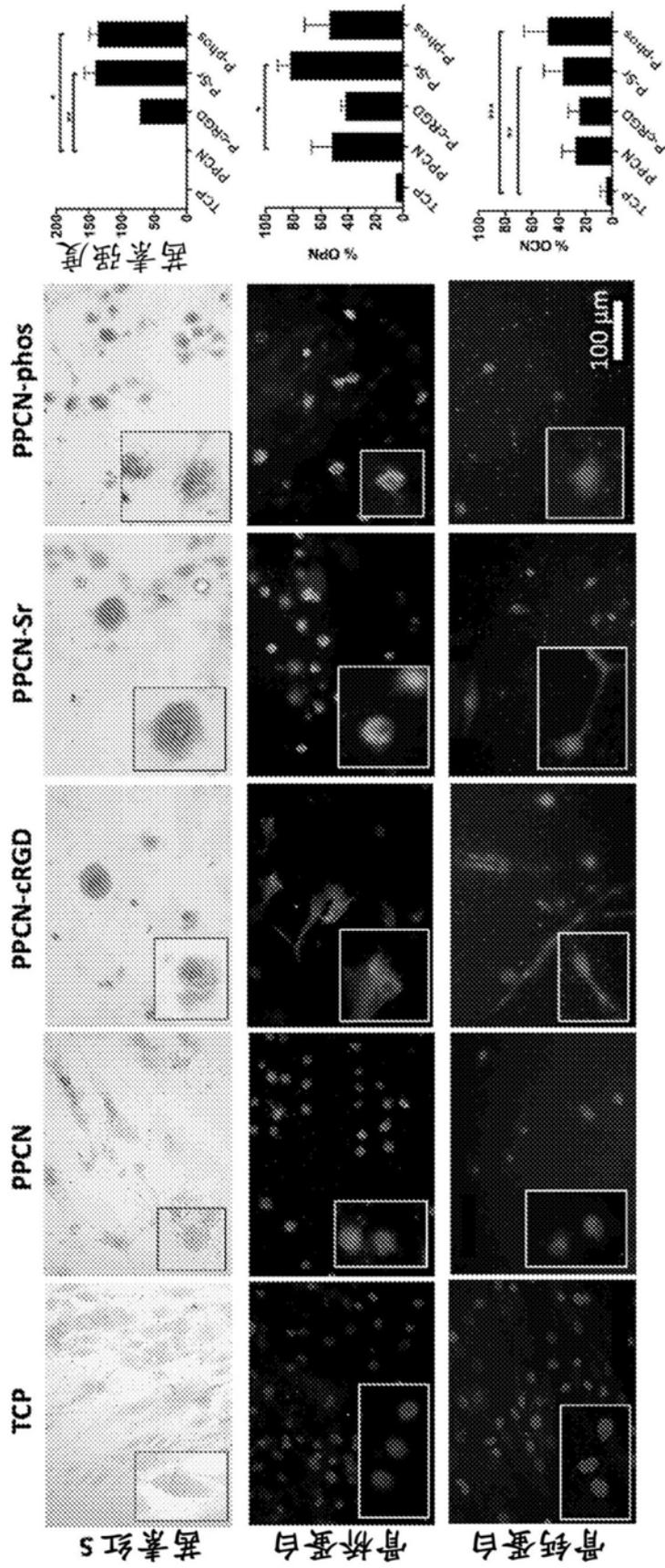


图5

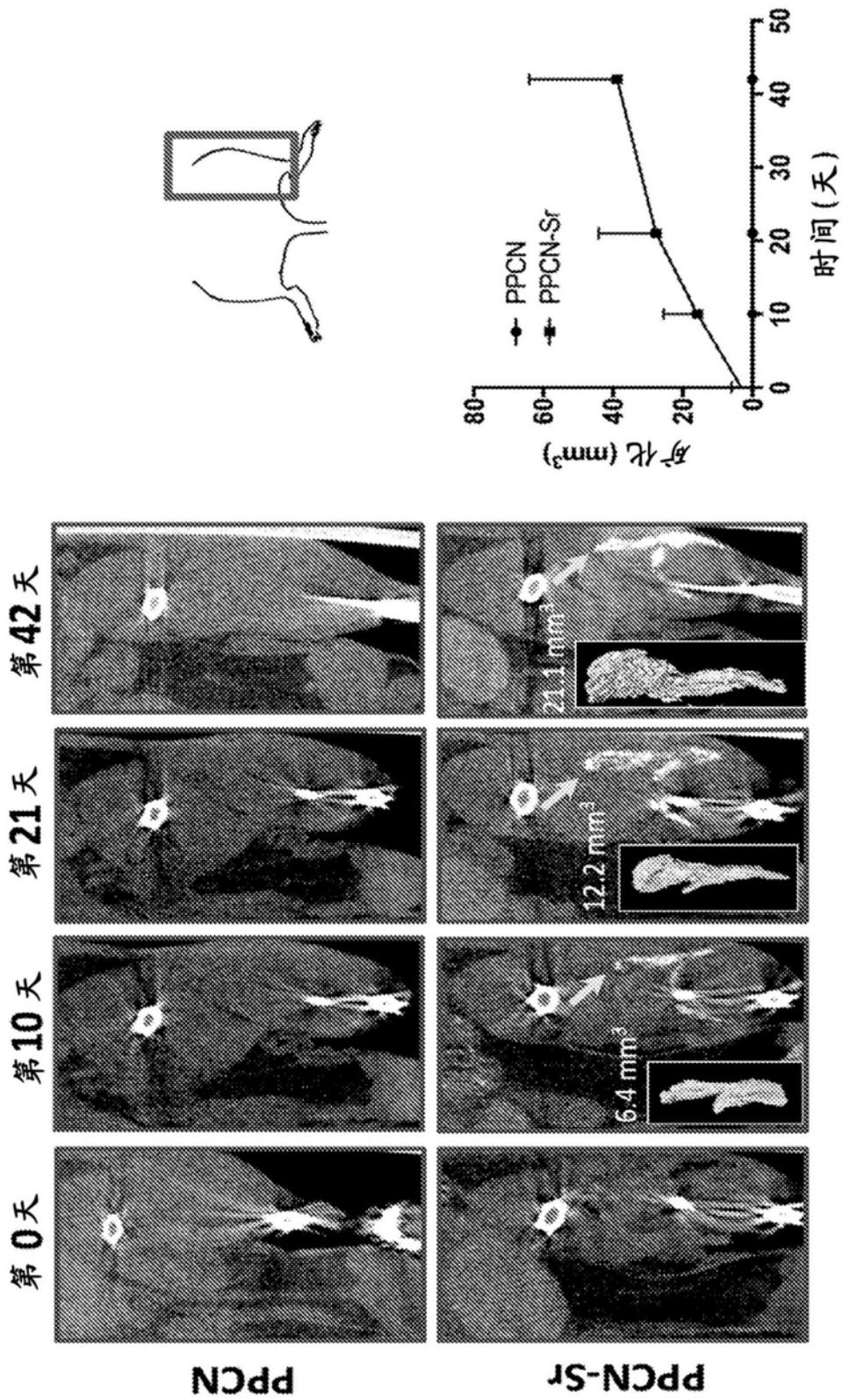


图6

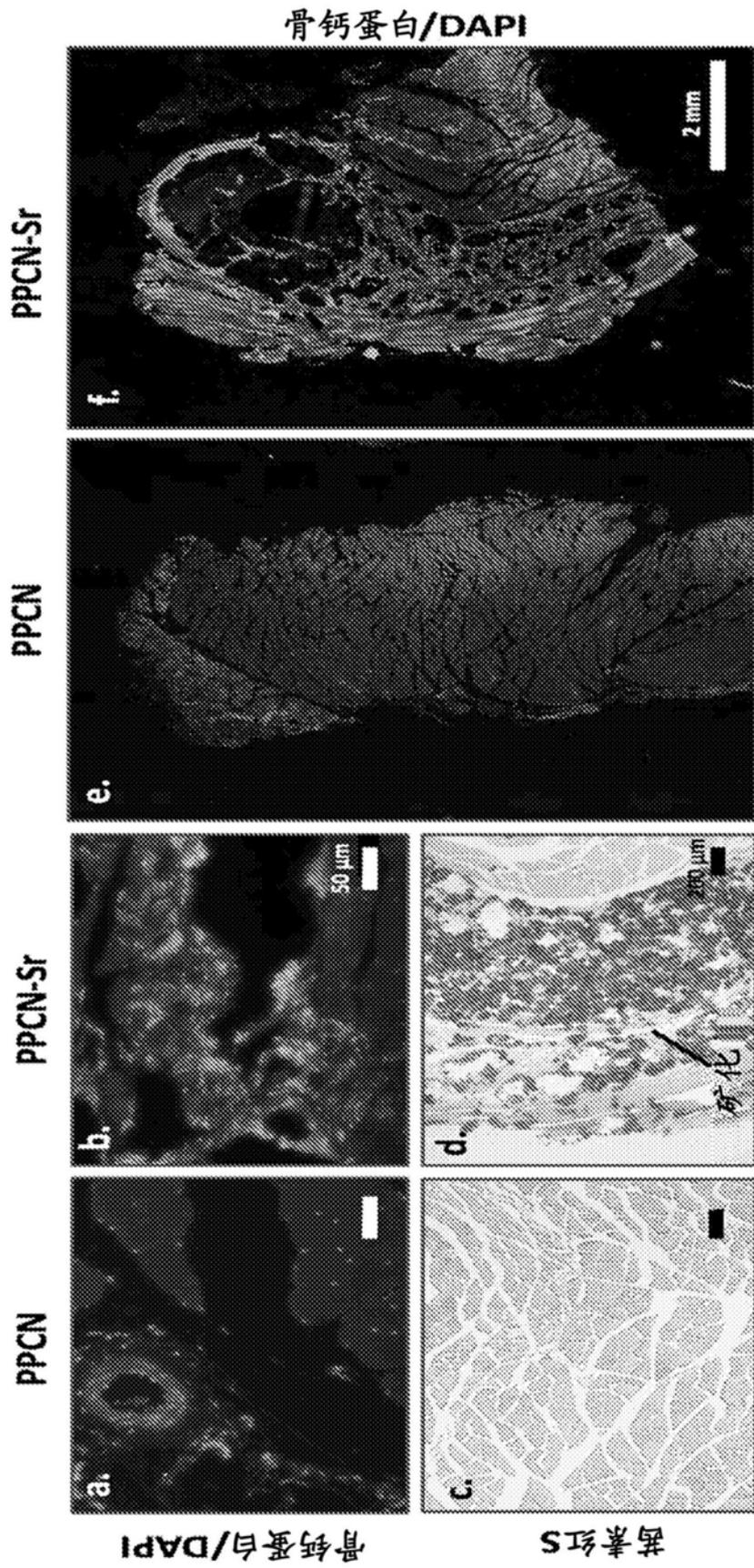


图7

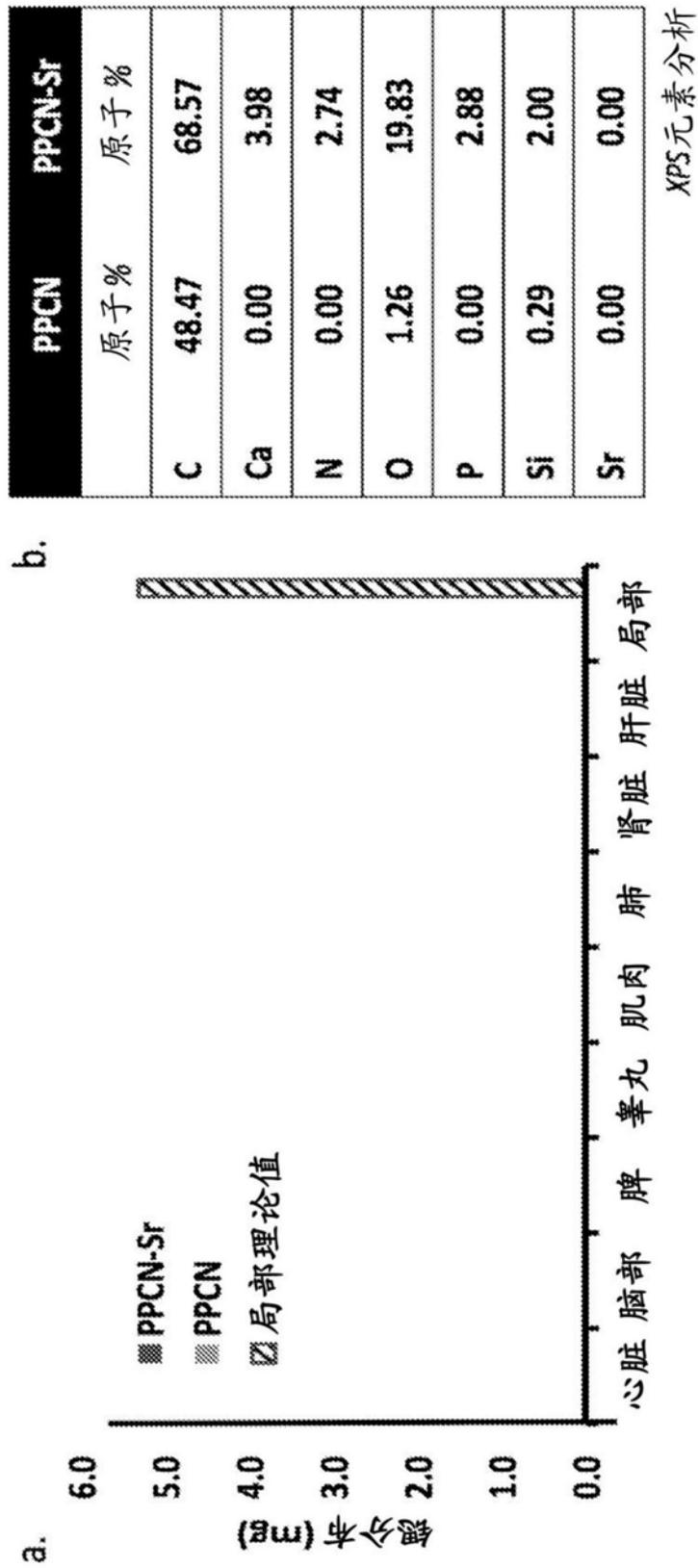


图8